

한국인 폐경 후 여성에서 비타민 D 수용체 유전자 프로모터의 Cdx-2 다형성이 골밀도에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실

김세화 · 이유미 · 박소영 · 김폴미 · 이시훈 · 안철우 · 차봉수 · 김경래 · 이현철 · 임승길

The Effects of Cdx-2 Polymorphism in the Promoter Region of the Vitamin D Receptor Gene on Bone Mineral Density in Postmenopausal Korean Women

Se Hwa Kim, Yumie Rhee, So Young Park, Dol Mi Kim, Shi Hoon Lee,
Chul Woo Ann, Bong Soo Cha, Kyung Rae Kim, Hyun Chul Lee, Sung Kil Lim

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Objectives: The intestine-specific transcription factor Cdx-2 played an important role in the transcription of the human vitamin D receptor (VDR) gene. The objective of this study was to investigate the relationship between the Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the vitamin D receptor gene and the bone mineral density (BMD) in postmenopausal Korean women.

Methods: We enrolled 150 healthy postmenopausal women. The bone mineral density at the lumbar spine and proximal femur were measured by dual energy X-ray absorptiometry. The polymorphism was analyzed in the core sequence 5'-ATAAAAACTTAT-3' in the Cdx-2 binding site in the VDR gene promoter (Cdx-2 polymorphism).

Results: In 150 postmenopausal women, 30 were genotype Cdx-A (adenine at -3731 nucleotides relative to the transcription start site of human VDR gene 5'-ATAAAAACTTAT-3'), 54 were genotype Cdx-G (guanine at -3731 nucleotides, 5'-GTAAAACTTAT-3'), and 66 were genotype Cdx-AG (heterozygote). A significant intergroup difference in BMD was not found at the lumbar spine and proximal femur among the different genotypes ($p=ns$). There was no difference in distribution of the Cdx-2 genotype between the osteoporosis and control group ($\chi^2=1.76$, $P=0.415$). Even in the individuals with a low calcium intake (daily calcium intake less than 400 mg), there was no association of Cdx-2 genotype with lumbar spine BMD or proximal femur BMD.

Conclusion: These results showed that there was no significant effect of Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the vitamin D receptor gene on BMD in postmenopausal Korean women.

Key Words: Cdx-2, Cdx-2 polymorphism, Vitamin D receptor gene, Bone mineral density

골다공증이란 골 강도 (bone strength)의 약화로 인해 골절의 위험이 증가하는 것을 특징으로 하는

책임저자 : 임승길, 연세대학교 의과대학 내과학교실
Tel: 02)2228-1948, Fax: 02)393-6884
E-mail: lsk@yumc.yonsei.ac.kr

전신적인 골격 질환으로 정의되며, 골 강도에는 골량과 골질의 개념이 포함되어 있다¹. 골량의 결정과 골다공증의 발생은 유전적 인자와 환경적인 인자에 의해 영향을 받지만 이중 유전적인 소인이 매우 중요하여 최대 골량 형성의 70~80%가 유전적인 소

인에 의하여 결정되어 진다고 알려져 있다². 지금까지 골다공증을 일으키는 여러 후보 유전자들이 제시되고 있으며, 이중 에스트로겐 수용체 및 비타민 D 수용체 유전자 다형성이 골밀도를 결정하는 중요한 유전자로 보고되고 있다³⁻⁶.

비타민 D 수용체는 소장 상피 세포의 분화와 칼슘 흡수에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며^{7,8}, 연령이 증가할수록 비타민 D 수용체 수가 감소하며 칼슘을 흡수하는 능력도 감소하게 된다. Cdx는 장 특이(intestine-specific) 전사 인자로서 장 유전자 전사(intestinal gene transcription)와 상피세포의 분화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다⁹⁻¹². 이중 Cdx-2가 소장에서 비타민 D 수용체의 기능 증강자 요소(functional enhancer elements)와 특이적으로 결합하여 비타민 D 수용체 유전자의 표현을 조절한다¹³.

Arai 등¹⁴은 Cdx-2가 결합하는 비타민 D 수용체 유전자의 프로모터 부위에 다형성이 존재(이하 Cdx-2 유전자 다형성)하며 Cdx-2 유전자 다형성이 비타민 D 수용체 유전자의 활성도에 영향을 미쳐서 결과적으로 Cdx-2 유전자 다형성과 골밀도에 상관관계가 있음을 보고하였다. 이에 저자들은 한국인 폐경 후 여성에서 Cdx-2 유전자 다형성이 골 소실에 관여하는지 규명하기 위해 골밀도와 상관계에 대해 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

신촌세브란스병원 골다공증 클리닉에 내원하여 골밀도 검사를 시행한 폐경 후 여성 중 검사에 동의한 사람 250명을 대상으로 하였다. 이러한 연구 대상자 중에서 당뇨병, 간질환, 신장질환 등 급성 및 만성질환이 있거나 골대사에 영향을 줄 수 있는 약제를 복용한 여성 및 이차성 골다공증이 있는 경우(갑상선 기능 항진증, 부갑상선 기능 항진증, 류마치성 관절염, 기타 골질환)를 제외하고 150명을 최종 연구 대상으로 하였다. 자연적 폐경의 정의는 마지막 월경일로부터 12개월 이상 월경이 없고, 혈청 난포자

극 호르몬 농도가 40 mIU/mL 이상인 경우로 하였다.

2. 방법

1) 신체계측 및 혈액학적 검사

전체 대상군에서 신장, 체중을 측정하여 체질량 지수를 계산하였고, 8시간 이상 공복 후 채혈하여 간 기능, 신장 기능을 포함한 기본 혈액학적 검사를 시행하였으며, 혈청 25 (OH)D를 측정하였다. 일일 칼슘 섭취량은 동일한 영양사에 의해 food frequency questionnaire를 통해 계산하였다.

2) 골밀도 측정

전체 연구대상자에서 골밀도는 요추골(L2-4), 대퇴골 경부, 그리고 대퇴 전자부에서 이중 에너지 방사선 흡수계측기(Dual energy X-ray absorptiometry, DXA, Lunar Expert, USA)을 이용하여 측정하였다. 골밀도 측정기의 변이계수는 요추부에서 1.0%, 대퇴골 경부 1.5%이었다.

3) 말초혈액으로부터의 DNA 추출

대상자의 혈액 5 mL를 EDTA tube에 수집하여 실온에서 2,000 rpm으로 15분간 원심분리 한 후 buffy coat층을 취하여 새로운 tube에 옮긴 후 추출완충액(10 mM Tris, PH 8.0, 0.1M EDTA, 0.5% SDS)를 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양한다. 이후 proteinase K에 12시간 반응시켜서 단백질을 분해시킨후, 동량의 페놀을 가하여 15분간 혼합한 후 4°C에서 3,500 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액을 얻는다. 이 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담은 후 동량의 phenol/chloroform을 넣고 같은 방법으로 3,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻는다. 이 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담은 후 1/10용량의 3 M sodium acetate와 2배 용량의 99% ethanol을 가하여 DNA를 침전시킨 후 75% ethanol로 세척한다. 이를 건조시킨후 TE buffer (tris 10 mM, 1mM EDTA, PH 7.2)로 용해시킨다. 분리된 DNA는 분광광도계를 사용하여 260 nm와 280 nm에서 측정된 흡광도비(A260/280)가 1.7 이상임을 확인하였다.

4) Cdx-2 유전자 다형성 측정

비타민 D 수용체 프로모터중 Cdx-2가 결합하는 부위의 염기서열을 증폭하기 위하여 5' sense primer; 5'-TAGAAAACATTGTAGAACATC-3', 3' antisense primer; 5'-AGCTGTAGCAATG A AAGCA-AACC-3'를 이용하였다. Primer 20 pmol에 dNTP set, 10X PCR 반응액 (50 mM KCL, 1.25 mM MgCl₂, 10 mM Tris, PH 8.4), MgCl₂ 25 mM, Taq DNA polymerase (5,000 μ /mL, 0.25 unit)를 첨가하고, 총량이 50 μ l가 되도록 증류수를 첨가하여 잘 혼합하였다. DNA thermal cycle (Perkin Elmer Cruts, Norwalk, CT)을 이용하여 94°C에서 5분 간 하여 1 cycle 활성을 도운 후 denaturation을 94°C 에서 1분, annealing을 60°C에서 1분, extension을 72°C에서 1분으로 하여 35 cycle 시행한 후 extension을 72에서 5분간 하여 DNA 증폭의 활성을 도왔다. 중합효소 연쇄반응 산물은 Quiagen Agarose Spine Columns을 이용하여 purification 시켰으며, 염기서열 분석은 ABI Prism 3700 DNA분석기를 이용하였다.

3. 통계분석

골다공증군과 정상골밀도의 대조군에서 Cdx-2 유전자형 분포의 차이는 χ^2 검사를 이용하였고, Cdx-2

유전자형에 따른 골밀도의 차이는 ANOVA를 이용하여 분석하였다. SPSS version 11.0을 사용하였으며, $P<0.05$ 인 경우 통계학적인 유의성이 있다고 하였다.

결 과

1. 대상환자들의 임상적 특징

대상환자들은 총 150명이었고 평균연령 56 ± 6.5 세, 폐경 후 나이 5.3 ± 2.1 세, 평균 체질량 지수는 23.9 ± 2.8 kg/m²이었다. 대상환자들을 골다공증군과 대조군으로 나누어 분석하였다. 본 연구에서 골다공증군은 요추부 Z-score 값이 -1.5 이하인 군으로, 대조군은 요추부 Z-score가 -1.0이상 1.0미만으로 임의로 정의하였으며, 이는 T-score 만으로 기준을 할 때 골밀도에 가장 큰 영향을 미치는 요인인 연령이 관여하는 것을 배제하기 위해서였다. 골다공증군의 골밀도는 요추부와 대퇴골 경부에서 각각 0.755 ± 0.094 g/cm², 0.693 ± 0.114 g/cm²이었고, 대조군의 골밀도는 요추부와 대퇴골 경부에서 각각 1.098 ± 0.153 g/cm², 0.867 ± 0.113 g/cm²이었다. 두 군에서 연령, 체질량지수, 일일 칼슘 섭취량, 그리고 혈청 25(OH)D 값에는 차이가 없었다 (Table 1).

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of the subject population

| | Osteoporosis group | Control group | P value |
|---------------------------------------|--------------------|-------------------|---------|
| Number of subjects | 86 | 64 | |
| Age (years) | 57 ± 7 | 56 ± 6 | 0.278 |
| Height (cm) | 155.7 ± 6.5 | 155.5 ± 4.6 | 0.780 |
| Weight (kg) | 57.5 ± 7.8 | 59.1 ± 7.4 | 0.257 |
| BMI (kg/cm ²) | 23.7 ± 2.9 | 24.3 ± 3.0 | 0.175 |
| 25(OH)D (ng/mL) | 17.3 ± 6.9 | 18.9 ± 5.1 | 0.487 |
| Calcium intake (mg/day) | 630.9 ± 239.7 | 596.6 ± 125.1 | 0.385 |
| Lumbar spine (g/cm ²) | 0.775 ± 0.094 | 1.098 ± 0.153 | <0.001 |
| Lumbar spine Z-score | -1.9 ± 0.4 | 0.3 ± 0.3 | <0.001 |
| Femur neck (g/cm ²) | 0.693 ± 0.114 | 0.867 ± 0.113 | <0.001 |
| Femur trochanter (g/cm ²) | 0.576 ± 0.115 | 0.755 ± 0.107 | <0.001 |

All data are given as mean values \pm SDs.

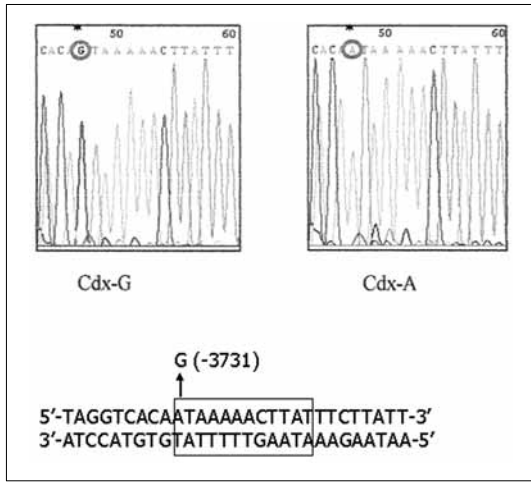


Fig. 1. Sequence determination on the polymorphism site in the promoter of the hVDR gene. Sequence data showed that Cdx-A allele is 5'-ATAAAAA-CTTAT-3' in the Cdx-2 binding site, while the Cdx-G allele is 5'-GTAAAACTTAT-3' in the Cdx-2 binding site.

Table 2. Distribution of genotype in subjects with osteoporosis and normal BMD

| Genotype | Subjects | |
|---------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| | Osteoporosis group (n=86) | Control group (n=64) |
| Cdx-AA | 20 (23.3%) | 10 (15.6%) |
| Cdx-AG | 38 (44.2%) | 28 (43.7%) |
| Cdx-GG | 28 (32.5%) | 26 (40.6%) |
| $\chi^2=1.761$, d.f=2, P=0.415 | | |

2. Cdx-2 유전자 다형성의 분포

염기서열 분석 결과 비타민 D 수용체 유전자의 프로모터 부위 중 Cdx-2 결합부위에서 다형성이 발견되었다 (Fig. 1). Cdx-AA 유전자형은 비타민 D 수용체 유전자 promoter의 transcription 시작부위 -3731 염기서열이 아데닌 (Adenine)인 경우이며, Cdx-GG 유전자형은 이 부위가 아데닌(Adenine)에서 구아닌 (Guanine)으로 치환된 경우이고, Cdx-AG 유전자형은 heterotype인 경우이다. 150명의 폐경 후 여성 중에서 30명 (20%)은 Cdx-AA, 54명 (36%)은

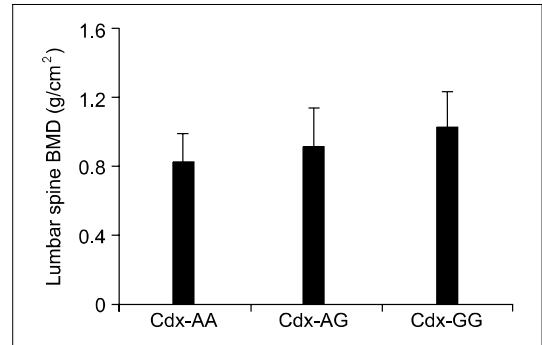


Fig. 2. Distribution of genotypes and lumbar spine (L2-4) BMD in postmenopausal women.

Cdx-GG, 66명 (44%)은 Cdx-AG 유전자형을 나타냈다.

3. Cdx-2 유전자 다형성과 골밀도와의 상관관계

골다공증군에서 Cdx-AA 유전자형을 보이는 경우는 20명 (23%), Cdx-AG 유전자형은 38명 (42%), Cdx-GG 유전자형은 28명 (33%)이었으며, 대조군에서 Cdx-AA 유전자형은 10명 (15%), Cdx-AG 유전자형은 28명 (44%), Cdx-GG 유전자형은 26명 (40%)를 나타냈다. 골다공증군과 대조군에서 Cdx-2 유전자형의 분포는 의미있는 차이를 보이지 않았다 ($\chi^2=1.761$, P=0.415) (Table 2).

Cdx-2 유전자형에 따른 골밀도를 살펴보면 Cdx-AA군에서 평균 요추부 골밀도는 $0.816 \pm 0.171 \text{ g/cm}^2$, Cdx-AG 군은 $0.900 \pm 0.233 \text{ g/cm}^2$, Cdx-GG 군은 $1.016 \pm 0.204 \text{ g/cm}^2$ 으로 AA 군에서 가장 낮은 골밀도를 보이고, GG 군에서 높은 골밀도를 보였으나 각 군간에 의미있는 차이는 없었다 (Fig. 2). 각 군에서 연령이 골밀도에 미치는 영향을 배제하기 위해 Z-score를 기준으로 골밀도에 차이가 있는지 살펴보았는데 요추부에서는 Z-score가 Cdx-AA 군에서 -1.14 ± 0.04 , Cdx-AG 군에서 -0.91 ± 0.07 , Cdx-GG 군에서 -0.60 ± 0.05 으로 Cdx-AA 군에서 골밀도가 가장 낮고 Cdx-GG 군에서 가장 높은 경향을 보였으나 의미있는 차이는 없었으며, 대퇴골 경부 및 전자부에서도 Cdx-2 유전자형에 따른

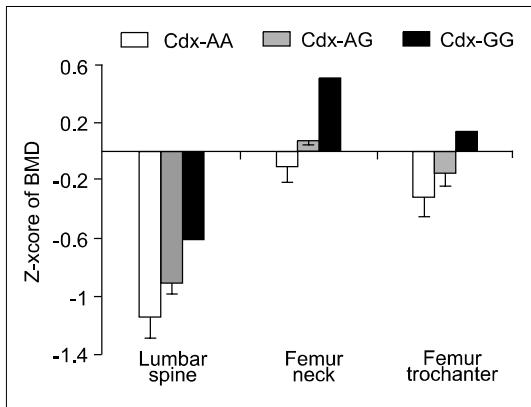


Fig. 3. Z-score of lumbar spine and proximal femur BMD in relation to Cdx-2 genotype in all subjects.

골밀도 차이는 없었다(Fig. 3). 일일 칼슘 섭취량이 400 mg/day 미만인 저칼슘 섭취군에서 Cdx-2 유전자 다형성과 골밀도와의 상관관계를 살펴보았다. 요추부에서는 Z-score가 Cdx-AA군; -1.39 ± 0.16 , AG군; -0.74 ± 0.04 , GG군; -0.26 ± 0.04 으로 Cdx-AA군에서 가장 낮고 Cdx-GG군에서 가장 높은 경향을 나타냈으나 의미 있는 차이는 없었으며, 대퇴골 경부와 전자부에서도 비슷한 결과를 보였다(Fig. 4).

고 찰

본 연구에서는 한국인 폐경 후 여성에서 Cdx-2 유전자 다형성의 유전자형에 따라 골밀도의 차이를 보이지 않았다. 또한 일일 칼슘 섭취량이 400 mg 미만인 저칼슘 섭취군에서도 Cdx-2 유전자 다형성과 골밀도는 상관관계를 보이지 않았다.

1,25-dihydroxyvitamin D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$]는 소장에서 칼슘을 흡수하는 데 매우 중요한 역할을 하며, 비타민 D 수용체 수가 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 에 대한 표적세포 반응 정도를 결정하는 데 중요한 역할을 한다. 조직에서 비타민 D 수용체 수를 조절하는 기전은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않지만, 여러 가지 요인에 의해 영향을 받을 수 있다¹⁵. 이중 연령이 증가함에 따라 소장에서 비타민 D 수용체 수와 칼슘을 흡수하는 능력이 점차 감소한다는 것은 잘 알려져 있으며^{16~18},

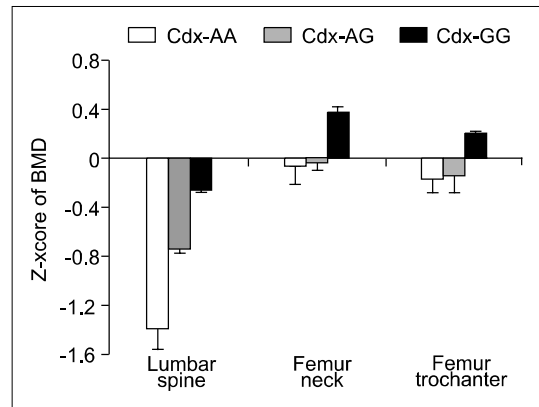


Fig. 4. Z-score of lumbar spine and proximal femur BMD in relation to Cdx-2 genotype in low calcium intake subjects.

연령 증가나 폐경에 의해서 소장에서 비타민 D 수용체 수가 감소하여 이로 인해 골다공증이 발생할 가능성이 있음도 보고되었다¹⁶.

Arai 등은 비타민 D 수용체 유전자 프로모터 중 Cdx-2가 결합하는 부위 유전자에 다형성이 존재하며, Cdx-2 유전자 다형성이 비타민 D 수용체 유전자의 활성도에 영향을 미친다고 하였다. 즉, Cdx-2 A-allele인 경우 비타민 D 수용체의 프로모터와 Cdx-2의 결합이 G-allele인 경우보다 더 강하게 일어나서 결과적으로 비타민 D 수용체 유전자의 전사를 더 증가시킨다고 보고하였으며, 이는 AA or AG 유전자형의 경우 소장의 상피세포에서 비타민 D 수용체 수가 더 높을 수 있음을 시사한다고 하였다. 또한 일본인 여성에서 Cdx-2 유전자 다형성과 골밀도 사이에 상관관계가 있음을 보고하였다. 즉, 일본인 폐경 후 여성에서는 Cdx-AA 유전자형에서 Cdx-GG 또는 Cdx-AG 유전자형에서보다 골밀도가 더 높다고 보고하였다. 최근 Fang 등¹⁹은 2,848명의 백인을 대상으로 한 대규모 전향적 연구에서 Cdx-2 A-allele을 가지고 있는 경우 비특정 골절의 위험도가 의미있게 낮아서 A-allele이 골다공증성 골절의 발생에 보호 효과가 있다고 하였으나 A-allele의 골절위험도의 감소를 설명하기 위하여 골밀도를 비교하였는데 Cdx-2 유전자형에 따른 골밀도의 차이는 없다고 하였다. 본 연구에서는 골다공증군과 대조

군에서 Cdx-2 유전자형 분포의 차이는 보이지 않았으며 Cdx-2 유전자형에 따른 골밀도의 차이도 없었다. 그러나 본 연구에서는 대상환자의 수가 적고 환자의 평균 연령이 56세로 골절의 유병률이 너무 낮아서 골절과 Cdx-2 유전자 다형성과의 연관성을 살펴 볼 수는 없었다. 그럼에도 불구하고 백인이나 일본인을 대상으로 한 다른 연구에서와는 상반된 결과를 보이는 데 이에 대한 이유를 설명하기 어려웠다. 그러나 가능한 설명으로 골 대사에 영향을 미치는 여러 환경적 인자들이 각 민족마다 다를 수 있다는 것과, Cdx-2 A-allele을 가지는 경우 비타민 D 수용체 수가 증가되어 칼슘 흡수가 부분적으로 증가한다고 해도, 이것이 폐경 후 호르몬 결핍에 따른 골소실을 상쇄하지는 못하여 골밀도나 골절에 큰 영향을 주지 않을 가능성이 있다는 것이다.

소장에서 fractional 칼슘 흡수는 칼슘 섭취가 감소함에 따라 증가한다^{20~22}. 칼슘제한에 따른 흡수 증가의 보상적인 반응은 활성형 비타민 D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$]에 의해 매개되는 능동적인 칼슘흡수의 증가에 기인한다. 일일 칼슘 섭취량이 500 mg 이상인 경우에 칼슘섭취가 증가하면 수동확산에 의해 칼슘 흡수량이 증가하게 되며²³, 저칼슘 섭취군에서는 능동적인 칼슘흡수가 주 기전이다. 한 연구에서는 비타민 D 수용체 유전자형이 다른 경우 능동적인 칼슘 흡수에 영향을 미치고, 이와 같은 현상은 능동적인 흡수가 중요한 저칼슘 섭취군에서 더욱 분명해진다고 하였다. 즉, 칼슘섭취가 많을 때는 주로 수동적인 방법으로 흡수되므로 각 유전자의 유형별로 소장에서의 칼슘 흡수에 차이가 없지만, 저 칼슘군에서는 유전자의 유형에 따라 칼슘 흡수에 차이가 생긴다는 것을 보고하였다. 본 연구에서도 일일 칼슘 섭취량에 근거하여 저칼슘군(일일 칼슘섭취량 400 mg 미만)만을 따로 분석하였는데, 전체 대상군에서의 결과와 마찬가지로 Cdx-2 유전자형에 따라 골밀도의 차이를 나타내지 않았다. 그러나 본 연구는 대상환자의 수가 적고, 단면적인 연구로 Cdx-2 유전자 다형성에 따른 골절의 발생률의 차이 등을 관찰할 수 없었고, 실제로 Cdx-2 유전자형에 따라 칼슘흡수가 어떻게 영향을 받는지에 대한 검사가 시행되지 못한 제한점을 가지고 있다.

결론적으로 Cdx-2 유전자 다형성이 한국인 폐경 후 여성의 골밀도와는 상관관계가 없었으며, 이는 Cdx-2 유전자 다형성이 한국인에서는 폐경 후 골소실에 영향을 미치지 않는다는 것을 제시한다고 하겠다.

요 약

목적: 한국인 폐경 후 여성에서 Cdx-2 유전자 다형성이 골밀도에 미치는 영향에 대해서 알아보고자 하였다.

방법: 신촌세브란스병원 골다공증 클리닉에 내원한 폐경 후 여성 150명을 골다공증군과 대조군으로 분류하였다. 요추부와 균위 대퇴부에서 이중에너지 방사선 흡수법으로 골밀도를 측정하였으며, 신체계측, 기본 혈청 화학검사, $25(\text{OH})\text{D}$ 를 측정하였고, 일일 칼슘 섭취량을 조사하였다. 비타민 D 수용체 유전자의 프로모터 부위에 Cdx-2가 결합하는 부위 다형성 (Cdx-2 polymorphism) 을 조사하였다.

결과: Cdx-AA 유전자형은 비타민 D 수용체 유전자 프로모터의 transcription 시작부위 -3731 염기서열이 아데닌 (Adenine)인 경우, Cdx-GG 유전자형은 이 부위가 아데닌 (Adenine)에서 구아닌 (Guanine)으로 치환된 경우, Cdx-AG 유전자형은 heterotype인 경우로 정의하였다. 골밀도에 따라 골다공증군과 대조군으로 분류 하였을 때 Cdx-2 유전자형의 분포는 두 군에서 의미있는 차이를 보이지 않았다 ($\chi^2=1.761$, $P=0.415$). 또한 Cdx-2 유전자형에 따라 골밀도의 차이를 살펴보았는데 Cdx-AA군에서 Cdx-GG군에 비해 골밀도가 더 낮은 경향을 보였으나 의미있는 차이는 없었다. 비타민 D 수용체의 활성도에 따라 칼슘 흡수에 영향을 더 많이 미칠 것으로 판단되는 저칼슘 섭취군에서도 전체 대상 환자군에서와 동일하게 Cdx-2 유전자 형에 따른 골밀도의 차이는 없었다.

결론: 한국인 폐경 후 여성에서 Cdx-2 유전자 다형성이 골밀도에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단되나 대규모의 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

중심단어: Cdx-2, Cdx-2 유전자 다형성, 골밀도, 비타민 D 수용체

참 고 문 헌

1. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. NIH Concepts Statement. 2000;17:1-45.
2. Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ, Norton JA, Hohnston CC Jr. Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner Res* 1991;6:516-7.
3. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J. Bone Miner Res* 1996;11:306-11.
4. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Disman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6665-9.
5. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994;367:184-7.
6. Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA, Tawa T, Miura Y, Fukamachi K, et al. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 1996;11:1003-9.
7. Huang YC, Lee S, Stolz R, Gabrielides C, Pansini-Porta A, Bruns ME, et al. Effect of hormones and development on the expression of the rat 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene. *J Biol Chem* 1989;264:17454-61.
8. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yammaki T, et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:4990-4.
9. Yamamoto H, Miyamoto K, Bailing Li, Taketani Y, Kitano M, Inoue Y, et al. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. *J Bone Miner Res* 1999;14:240-7.
10. Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994;14:7340-51.
11. Troelsen JT, Michelsmore C, Spodsberg N, Jensen AM, Noren O, Sjoström H. Regulation of latase-hlorizin hydrolase gene expression by the caudal-related homeodomain protein Cdx-2. *Biochem J* 1997;322:833-8.
12. Suh E, Traber PG. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 1996;16:619-25.
13. Traber PG, Silberg DG. Intestinal specific gene transcription. *Annu Rev Physiol* 1996;58:275-97.
14. Arai H, Miyamoto K, Yoshida M, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K, et al. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res* 2001;16:1256-64.
15. Walters MR. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 1992;13:19-23.
16. Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA. Advancing age results in the reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor. *Endocrinology* 1990;126:1053-7.
17. Liang CT, Varnes J, Imanaka S, DeLuca HF. Alterations in mRNA expression of duodenal 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and vitamin D-dependent calcium binding protein in aged Wistar rats. *Exp Gerontol* 1994;29:179-86.
18. Russell JE, Morimoto S, Brige SJ, Fausto A, Avioli LV. Effects of age and estrogen on calcium absorption in the rat. *J Bone Miner Res* 1986;1:185-9.
19. Fang Y, Van Meurs JBJ, Bergink AP, Hofman A, Van Duijn CM, Van Leeuwen JP, et al. Cdx-2

- polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. *J Bone Miner Res* 2003;18:1632-41.
20. Spencer H, Lewin I, Fowler J, Samachson J. Influence of dietary calcium intake on Ca⁴⁷ absorption in man. *Am J Med* 1969;46:197-205.
21. Heaney RP, Saville PD, Recker RR. Calcium absorption as a function of calcium intake. *J Lab Clin Med* 1975;85:881-90.
22. Gallagher JC, Riggs BL, Eisman J, Hamstra D, Arn SD, Deluca HF. Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients. effects of age and dietary calcium. *J Clin Invest* 1979;64:729-36.
23. Ireland P, Fordtrans JS. Effect of dietary calcium and age on jejunal calcium absorption in humans studied by intestinal perfusion. *J Clin Invest* 1973; 2:2672-81.